

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.



## JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: 09299093

(43)Date of publication of application: 25.11.1997

(51)Int.Cl.

C12P 19/14  
//(C12P 19/14  
C12R 1:125 )

(21)Application number: 08143624

(71)Applicant:

HOKKAIDO TOGYO KK

(22)Date of filing: 14.05.1996

(72)Inventor:

HIWATARI KAZUHISA  
ISHIKAWA HIROSHI  
SASAZUKA TADASHI  
SHIBATA KAZUHIKO

## (54) PRODUCTION OF ARABINOSE FROM BEET ARABINAN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce an arabinose having inhibiting activities against disaccharide hydrolases in high yield by hydrolyzing a beet arabinan at a high hydrolytic limit.

SOLUTION: An inoculum of *Bacillus subtilis* capable of producing a beet arabinan hydrolase capable of hydrolyzing a beet arabinan at a high hydrolytic limit with a high potency is cultured to afford a beet arabinan hydrolase, which is then used to hydrolyze the beet arabinan and produce an arabinose.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.05.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3031534

[Date of registration] 10.02.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09299093 A**

(43) Date of publication of application: **25.11.97**

(51) Int. Cl.

**C12P 19/14**  
**/(C12P 19/14 , C12R 1:125 )**

(21) Application number: **08143624**

(22) Date of filing: **14.05.96**

(71) Applicant: **HOKKAIDO TOGYO KK**

(72) Inventor: **HIWATARI KAZUHISA**  
**ISHIKAWA HIROSHI**  
**SASAZUKA TADASHI**  
**SHIBATA KAZUHIKO**

(54) **PRODUCTION OF ARABINOSE FROM BEET  
ARABINAN**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce an arabinose having inhibiting activities against disaccharide hydrolases in high yield by hydrolyzing a beet arabinan at a high hydrolytic limit.

SOLUTION: An inoculum of *Bacillus subtilis* capable of

producing a beet arabinan hydrolase capable of hydrolyzing a beet arabinan at a high hydrolytic limit with a high potency is cultured to afford a beet arabinan hydrolase, which is then used to hydrolyze the beet arabinan and produce an arabinose.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-299093

(43)公開日 平成9年(1997)11月25日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/14			C 1 2 P 19/14	Z
// (C 1 2 P 19/14				
C 1 2 R 1:125)				

審査請求 有 請求項の数 2 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平8-143624

(22)出願日 平成8年(1996)5月14日

(71)出願人 000241968

北海道糖業株式会社

東京都千代田区神田神保町2丁目1番地

(72)発明者 樋渡 和寿

北海道北見市東陵町44-10

(72)発明者 石川 弘

北海道北見市田端町17-8

(72)発明者 笹塚 忠

北海道北見市北上101-15

(72)発明者 柴田 和彦

北海道北見市北上101-15

(74)代理人 弁理士 田中 昭雄

(54)【発明の名称】 ビートアラビナンよりアラビノースを製造する方法

(57)【要約】

【解決手段】 ビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産するバチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) 種菌を培養してビートアラビナン分解酵素を得、この酵素を用いてビートアラビナンを分解してアラビノースを製造する方法。

【効果】 ビートアラビナンを高分解限度で分解して高い収率で二糖水解酵素阻害活性を有するアラビノースを生成することができ、その工業的有用性は大きい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産するバチルス・サブチリス種菌を培養してビートアラビナン分解酵素を得、該酵素を用いてビートアラビノンを分解してアラビノースを得ることを特徴とするビートアラビナンよりアラビノースを製造する方法。

【請求項2】 ビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産するバチルス・サブチリス種菌がバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*) H-4 (FERM P-15482)、IFO3007、IFO3108、IFO3134、IFO3335、IFO3336、IFO14440またはATCC6633、ATCC6984、ATCC7003、ATCC7058、ATCC7060、ATCC7067 菌株から選ばれた1種または2種以上である請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ビートアラビナンを高分解限度で分解して、高い収率でアラビノースを製造する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】アラビノースは蔗糖(砂糖)の8割程の甘味強度を持つ、上品な甘味質の糖質であり、殆ど腸管粘膜からは吸収されず、また僅かに吸収されても大部分は尿中へ排泄され、代謝系へ取り込まれてエネルギー源とはならないことが知られているが、特に最近アラビノースの機能として蔗糖やマルトース等の二糖類と共に摂取すると、蔗糖やマルトースはアラビノースによって消化吸収が妨げられ、単に甘味物質として味蕾に作用するだけでエネルギー源とはならない、即ち二糖水解酵素阻害活性が存在することが明らかとなった。

【0003】このため、アラビノースは糖質食品として大いに注目されており、その工業的な製造方法の開発が望まれている。

【0004】L-アラビノースはヘミセルロース中にアラビナン、アラビノキシラン、ガムアラビック、アラビノガラクトムとして高濃度に存在している。

【0005】一方、ビートから蔗糖を回収した後に排出されるパルプ中には、乾物重量当たりアラビノースが12~13%程度存在するが、これらビートパルプ中におけるアラビノースはその多数が鎖状に結合した多糖類であるアラビナンとして存在する。

【0006】これらアラビナンのうちその3割はその主成分がアラビノースの1,5結合の主鎖に一分子おきに別のアラビノースが一分子だけ1,3結合している、所謂「櫛の歯状」の形状を持つL-アラビノースであり、他の7割は構造未同定のアラビナンである。

【0007】これらビートパルプからアラビノースを回収可能な方法としては、多糖類をアルカリ抽出し、抽出された多糖類を酸で分解する、所謂「アルカリ抽出-酸

分解法」と多糖類をアルカリ抽出し、抽出された多糖類を酵素で分解する、所謂「アルカリ抽出-酵素分解法」が考えられる。

【0008】「アルカリ抽出-酸分解法」は一般に構造解析などの研究目的のために多糖類からオリゴ糖や単糖類を製造する際に用いられている。

【0009】「アルカリ抽出-酵素分解法」としてはビートパルプ中のアラビナンを酵素で分解する研究についてA. Kaji, H. Taki, A. Shimazaki, T. Shinkai (Tech. Bull. Fac. Aga. Kagawa Univ., 15, 34(1963)または日下部、安井、小林(日本農芸化学会誌, 49, 295(1975))、L. Weinstein, P. Albersheim (Plant Physiol 63, 425(1979))等による報告がなされている。

【0010】上記二方法のうち、「アルカリ抽出-酸分解法」は極pH、高温等の強い条件が必要であり、装置的、または取扱操作上において反応条件の設定が難しく、従って工業的規模において行うには難点がある。

【0011】また、回収されたアラビナン中に、用いた多量の酸やアルカリが残留し、そのために精製工程において大きなコストアップとなる等の難点もある。

【0012】一方、「アルカリ抽出-酵素分解法」はpHが中性近傍、温度が室温付近での穏やかな反応が可能で工業的に条件の設定が容易であり、精製負荷が軽いなどビートパルプを原料とするアラビノース抽出には最適であると考えられる。

## 【0013】

【発明が解決しようとする課題】これら「アルカリ抽出-酵素分解法」では各種の微生物から得られた酵素が使用されている。

【0014】例えば、A. Kajiら(Tech. Bull. Fac. Aga. Kagawa Univ., 15, 34(1963))はアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)の酵素を用いた反応について報告しているが、ビートアラビナンの分解率が53%と低い。

【0015】またA. Kajiら(*Biochica et Biophysica Acta*, 410, 354(1945))、或はS. Kanekoら(*Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3425(1994))はバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)の酵素を用いて反応について報告しているが、ビートアラビナンの分解率がそれぞれ3.3%又は15%と低い。

【0016】他方、日下部ら(日本農芸化学会誌, 49, 295(1975))はアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)の酵素を用いた反応で100%の分解限度に達したと報告されている。

【0017】しかし、この酵素は分解限度が高いものの、酵素活性が8mg 75℃/5ml酵素液・30min反応であり、1分間に1マイクロモルのアラビノースを生成する酵素量を1単位と定義すると、0.3単位/mlに換算され、非常に低い。

【0018】このように、従来知られている酵素は、ビートパルプを原料とする総アラビナンから工業的にアラ

ビノースを回収するためには分解限度、或は酵素活性において満足できるものではなかった。

【0019】これに対して、本願発明者はビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産する菌株を広く自然界より検索を行った結果、北海道常呂郡置戸町常元地区の原生林から採取された土壤中から分離されたバチラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*) H-4 と同定された菌株及び微生物分類学的に同族、同種に属するバチラス・サブチリス種菌株が目的に適うことを見出した。

#### 【0020】

【課題を解決するための手段】そこで、この発明では上記知見に基づいてビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産するバチルス・サブチリス種菌を培養してビートアラビナン分解酵素を得、該酵素を用いてビートアラビノンを分解してアラビノースを得る方法を提案するものである。

【0021】この発明で使用するバチルス・サブチリス種菌の代表例として挙げられるH-4菌株は、次のような菌学的性質を有する。なお菌学的性質の試験及び分類は「バージェズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)(1986)」に基づいて行った。

#### 【0022】A. 形態

1. 細胞の形	桿菌
2. 細胞の大きさ	0.8×1.9 μm
3. 運動性の有無	+
4. 胞子の有無	+
5. グラム染色	+

#### 【0023】B. 生理学的性質

1. カゼイン分解性	+
2. 澱粉分解性	+
3. DNAse分解性	-
4. 尿素分解性	-
5. ゼラチン	+

#### 【0024】C. 酸生成

1. デキストロース	+
2. セロビオース	+
3. ガラクトース	-
4. マンノース	+
5. メリビオース	+
6. ラフィノース	-
7. サリシン	+
8. キシロース	+
9. ONPG	+

#### 【0025】

D. 10% 食塩中での生育	-
E. 嫌気状態下での生育	-
F. Voges-Proskauer test	+
G. 酸化反応	-

H. NGKG培地での生育	-
1. 馬尿酸塩の分解	+
J. 50℃での生育	+

#### 【0026】K. 炭水化物の代謝

1. グリセリン	+
2. エリスリトール	-
3. D-アラビノース	-
4. L-アラビノース	+
5. リボース	+
10 6. D-キシロース	+
7. L-リキソース	-
8. アドニトール	-
9. β-メチル-D-キシロシド	-
10. ガラクトース	-
11. グルコース	+
12. フラクトース	+
13. マンノース	+
14. ソルボース	-
15. ラムノース	-
20 16. ダルシトール	-
17. イノシトール	+
18. マンニトール	+
19. ソルビトール	+
20. α-メチル-D-マンノシド	-
21. α-メチル-D-グルコシド	+
22. N-アセチルグルコサミン	-
23. アミグダリン	+
24. アルブチン	+
25. エスクリン	+
30 26. サリシン	+
27. セロビオース	+
28. マルトース	+
29. ラクトース	-
30. メリビオース	+
31. シュークロース	+
32. トレハロース	+
33. イヌリン	+
34. メレチトース	-
35. ラフィノース	+
40 36. 澱粉	+
37. グリコゲン	+
38. キシリトール	-
39. ゲンチオビオース	+
40. D-ツラノース	+
41. D-リキソース	-
42. D-タガトース	-
43. D-フコース	-
44. L-フコース	-
45. D-アラビトール	-
50 46. L-アラビトール	-

47. グルコンサン塩 —  
 48. 2-ケト-グルコンサン塩 —  
 49. 5-ケト-グルコンサン塩 —  
 【0027】生物学的性状  
 1.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ +  
 2. アルギニンジヒドラーゼ —  
 3. リジンデカルボキシラーゼ —  
 4. オルニチンデカルボキシラーゼ —  
 5. 硫化水素産性 —  
 6. ウレアーゼ —  
 7. トリプトファンデアミナーゼ —  
 8. インドール産性 —  
 9. VP反応 +

【0028】以上の菌学的な性質より上記菌株はパチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*) H-4と同定され、この菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、その寄託番号はパチルス・サブチリスH-4 (FERM P-15482) であった。

【0029】なお、この発明に使用するに適するビートアラビナンを高分解限度で分解するビートアラビナン分解酵素を高力価で生産するパチルス・サブチリス種菌としては上記H-4菌株が最も好ましいが、これ以外同族、同種に属する、IFO(財団法人 発酵研究所、以下同じ) 3007, IFO3108, IFO3134, IFO3335, IFO3336, IFO14140 またはATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション、以下同じ) 6633, ATCC6984, ATCC7003, ATCC7058, ATCC7060, ATCC7067等のパチルス・サブチリス種菌株を使用することができる。

【0030】また、この発明では高い分解限度でビートアラビナンを分解する酵素を高活性で産生する能力を有する上記菌株以外のパチルス・サブチリス種菌株及びこれらの菌株の天然または人為的変異法によって得られた変異菌株を使用することができる。

【0031】上記微生物の培養にあたっては、通常用いられる固体培地あるいは液体培地の何れを用いてもよいが、液体培地の方が好ましい。微生物の培養に使用される培地は、炭素源としては微生物が利用できる炭素源を用いることができるが、好ましくはアラバン、澱粉、シェークロース、またはグルコースであり、窒素源としては酵母エキス、カゼイン、コーンスチープリカー、ペプトン、肉エキスなどの天然窒素源や硫酸、塩安、尿素あるいは硝酸ナトリウム等の無機窒素化合物を用いることができる。

【0032】炭素源の濃度は1~20%、窒素源は1~5%の範囲で、培養温度は20~35℃、培養時間は24~72時間程度であり、通気攪拌培養あるいは振盪培養、何れの方法でも行うことができる。

【0033】以下、この発明を実施例について具体的に説明するが、この発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0034】実施例1

##### (A) 総アラビナンの調製

ビートパルプ3.7Kgに2.5%水酸化カルシウム溶液12Lを加えて90~100℃で12時間加熱し、冷却後酢酸でpH6.0に調製してから濾布で濾過する。得られた濾液にエタノールを加えて沈殿を生成させ、この沈殿を濾集した後、水に溶解させてから再度エタノール沈殿を行い、粗アラビナンを得た。粗アラビナンは陽イオン交換樹脂ダイヤイオンPK216と陰イオン交換樹脂ダイヤイオンWA30を用いて脱塩した後乾燥して、総アラビナン55gを得た。

##### 【0035】(B) 培養

培地	
総アラビナン	10g
ペプトン	10g
酵母エキス	5g
硝酸ナトリウム	5g
リン酸二カリウム	1g
硫酸マグネシウム七水塩	0.5g
水道水	1000ml
pH	7.0

【0036】500ml 容三角フラスコに上記組成の培地をそれぞれ100ml取り、予め同培地で前培養しておいたパチルス・サブチリスH-4の培養液2mlを接種し、30℃で72時間、220回転で振盪培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離(1000RPM)して菌体を除去し、酵素液とした。2%総アラビナン溶液450 $\mu$ l(pH6.5, 0.1Mリン酸バッファー)を基質とし、これに酵素液50 $\mu$ lを添加して40℃で10分間反応を行って酵素活性を測定したところ10u/mlであった。ここで酵素活性1uとは、基質の総アラビナンを分解して、1分間に1 $\mu$ Mのアラビノースを生成する酵素量をいう。

##### 【0037】(C) アラビナンの分解例1

2%総アラビナン液(アラビノース純度72%, 0.1Mリン酸バッファー、pH6.5)1.0mlに酵素0.08Uを添加して40℃で18hr反応後、更に酵素を0.08U再添加して74hrまで反応を継続した。反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの83.3%が遊離生成していた。

##### 【0038】(D) アラビナンの分解例2

2.5%総アラビナン液(アラビノース純度71.8%, 0.1Mリン酸バッファー、pH6.5)1.0mlに酵素0.1Uを添加して40℃で18hr反応後、更に酵素を0.1U再添加して74hrまで反応を継続した。反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの74.5%が遊離生成していた。

##### 【0039】実施例2

実施例1と同様に培養・除菌して得た培養上澄みに75%飽和になるように硫酸を添加し、4℃で一夜放置した後、生じた沈殿を遠心分離して集めた。この沈殿面分を

pH6.5, 0.1Mリン酸バッファーに溶解し、更に同バッファーに対して透析脱塩して粗酵素液を得た。粗酵素液は同バッファーで酵素活性が15u/mlになるように希釈、調整した。

#### 【0040】(E) アラビナンの分解例3

2%総アラビナン液(アラビノース純度72%, 0.1Mリン酸バッファー, pH6.5)1.0mlに実施例2で調整した粗酵素0.08Uを添加して40℃で18hr反応後、更に酵素を0.08U再添加して74hrまで反応を継続した。反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビナン中のアラビノースの80.2%が遊離生成した。

#### 【0041】実施例3

##### (G) 酵素液の調製

財団法人 発酵研究所より購入したIF03007株を実施例1の(B)と同じ方法で培養し、酵素液を調製し、実施例1の方法で酵素活性を測定したところ5.3u/mlであった。

#### 【0042】(H) アラビナンの分解例4

2%アラビナン液450  $\mu$ L(アラビノース純度72%, 0.1Mリン酸バッファー, pH6.5)に酵素0.07uを添加して45時間反応後、反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの82%が遊離生成した。

#### 【0043】実施例4

##### (I) 酵素液の調製

財団法人 発酵研究所より購入したIF03108株を実施例3の(G)と同様に酵素液を調製した。酵素活性は4.7u/mlであった。

#### 【0044】(J) アラビナンの分解例5

実施例3の(H)と同様に2%アラビナン液450  $\mu$ Lに酵 \*

素0.06uを添加して45時間反応後、反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの81%が遊離生成した。

#### 【0045】実施例5

##### (I) 酵素液の調製

財団法人 発酵研究所より購入したIF014140株を実施例3の(G)と同様に酵素液を調製した。酵素活性は1.8u/mlであった。

#### 【0046】(J) アラビナンの分解例5

10 実施例3の(H)と同様に2%アラビナン液450  $\mu$ Lに酵素0.06uを添加して68時間反応後、反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの81%が遊離生成した。

#### 【0047】実施例6

##### (I) 酵素液の調製

アメリカタイプカルチャーコレクションより購入したATCC6633株を実施例3の(G)と同様に酵素液を調製した。酵素活性は1.7u/mlであった。

#### 【0048】(J) アラビナンの分解例5

20 実施例3の(H)と同様に2%アラビナン液450  $\mu$ Lに酵素0.06uを添加して72時間反応後、反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、総アラビノースの82%が遊離生成した。

#### 【0049】

【発明の効果】以上要するに、この発明はバチルス・サブチリス種菌から得られたビートアラビナン分解酵素を用いて、ビートパルプ中の総アラビナンを高い分解限度で分解するものであり、その工業的有用性は大きい。